

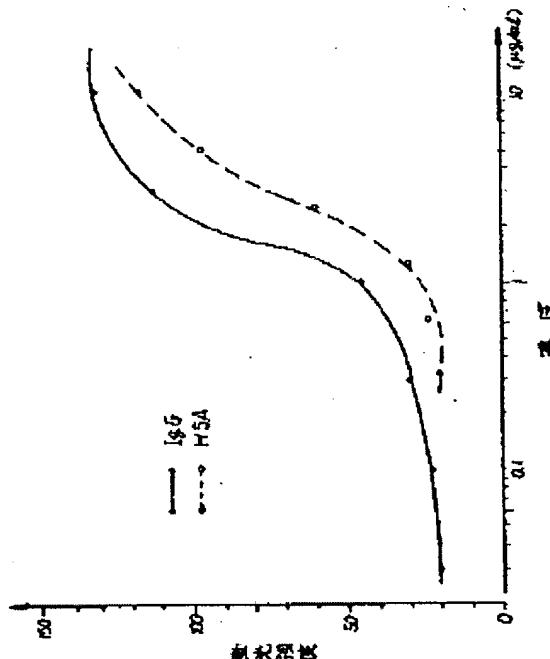
QUANTITATIVE DETERMINATION OF FINE PARTICLE BY MEASURING FLUORESCENT INTENSITY

Patent number: JP63036151
Publication date: 1988-02-16
Inventor: MIZUKOSHI TATSUYA; others: 01
Applicant: SHOWA DENKO KK
Classification:
- **international:** G01N33/543
- **European:**
Application number: JP19860177829 19860730
Priority number(s):

Abstract of JP63036151

PURPOSE: To enable simultaneous multinominal measurement with high sensitivity by using a reagent prep'd. by depositing sensitive materials conjugating specifically with each of materials to be measured to plural kinds of fine particles which are identifiable by labeling by grain sizes and fluorescent materials.

CONSTITUTION: The reagent for simultaneous measurement of two items is prep'd. by mixing, at an equal ratio, polystyrene beads of 7μm average grain size to which an anti-human IgG antibody is immobilized and polystyrene beads of 10μm average grain size to which anti-HSA antibody is immobilized. The above-mentioned reagent mixture is added to a standard soln. contg. IgA and HsA at various concns. to cause reaction. The particles in the resultant reaction liquid is analyzed by a flow sightmetry method to obtain a calibration curve. The quantities of ≥ 2 kinds of the materials to be measured are thereby measured simultaneously with high sensitivity.



Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan

⑫ 公開特許公報 (A) 昭63-36151

⑯ Int.Cl. 4
G 01 N 33/543識別記号 庁内整理番号
D-7906-2G

⑯ 公開 昭和63年(1988)2月16日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑬ 発明の名称 微粒子の蛍光強度測定による定量方法

⑯ 特願 昭61-177829

⑯ 出願 昭61(1986)7月30日

⑯ 発明者 水越 達也 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電工株式会社総合技術研究所内

⑯ 発明者 福井 勝治 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電工株式会社総合技術研究所内

⑯ 出願人 昭和電工株式会社 東京都港区芝大門1丁目13番9号

⑯ 代理人 弁理士 菊地 精一

明細書

1. 発明の名称

微粒子の蛍光強度測定による定量方法

2. 特許請求の範囲

1. 検体中に含まれているn種の被測定物質のそれぞれの量を、被測定物質のそれと特異的に結合するn種の感応物質を担持させた微粒子を担体として利用して測定する方法であって、粒径の大きさによって及び/又は感光物質による標識づけによってn種に判別できる該微粒子を担体として用い、各々の種類の担体にそれぞれの被測定物質と特異的に結合する前記n種の感応物質をそれぞれ担持させたものを試薬とし、n種の被測定物質を含む検体と混合し、反応を十分行なわせたのち、担体上に結合した被測定物質に蛍光活性を持たせ個々の微粒子の蛍光強度を測定することにより被測定物質の定量を行なうことを特徴とする微粒子の蛍光強度測定による定量方法。

2. 担体上に結合した被測定物質に蛍光活性を持たせる手段として、被測定物質と特異的に結合す

る感応物質の蛍光標識体を用いることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 担体上に結合した被測定物質に蛍光活性を持たせる手段として、まず感応物質を反応させ、さらにその感応物質と結合するもう1つの感応物質の蛍光標識体を用いることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

4. 特異的な結合が抗原・抗体反応であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

5. 微粒子の蛍光強度を、フローサイトメトリーによって測定することを特徴とする特許請求の範囲第1項又は第2項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、物質同志の特異的な結合、例えば抗原・抗体反応を利用した定量方法に関する。

(従来の技術)

医療分野における微量分析の手法として免疫学的反応を利用した測定法は、すでに定着しており、その中でも主流はラジオイムノアッセイ

(RIA) である。RIAは、1959年バーソン、ヤロウラによって、インスリンの測定法として開発されたのが最初であり、その後爆発的に普及した。しかしラジオアイソトープの取り扱い、専用の設備、廃棄の際の安全性、あるいは標識化合物の寿命等の問題も從来からクローズアップされており、RIAの代替として非放射性の標識法についての研究がさかんに行われてきた。感度的に匹敵するものとして1971年にエンザイムノアッセイ(EIA)が登場し、RIAに代わるものとして注目を浴びてきた。確かに測定項目によってはRIAと同程度、あるいはそれ以上の感度を持つことが報告されているし、RIAとは違い抗原抗体結合型と遊離型との分離、いわゆるB/F分離の必要がないホモジニアスな系での測定も可能であるという特長があるが、生物学的反応を用いるといった不安定な要素や、相対的に見た感度、煩雑さなどの問題もあり、今一つRIAにとって代わるだけのものがないのが現状であろう。ラジオアイソトープの代わりに蛍光プローブを用いた

(発明が解決する問題点)

本発明は、上記問題点を解決するためになされたものであり、これまでのEIAでは困難であった、検体中の被測定物質量の高感度かつ同時多項目測定法を提供することを目的とする。

(問題点を解決するための手段及び作用)

本発明は固相を用いたEIAのいわゆるサンドウィッヂ法の改善であり、固相として均一粒径微粒子群を用い、その粒子一つ一つの蛍光活性を分析することを特徴としており、その要旨は検体中に含まれているn種の被測定物質のそれぞれの量を、被測定物質のそれぞれと特異的に結合するn種の感応物質を担持させた微粒子を担体として利用して測定する方法であって、粒径の大きさによって及び/又は蛍光物質による標識づけによってn種に判別できる該微粒子を担体として用い、各々の種類の担体にそれぞれの被測定物質と特異的に結合する前記n種の感応物質をそれぞれ担持させたものを試薬とし、n種の被測定物質を含む検体と混ぜし、反応を十分行なわせたのち、担体

のが蛍光イムノアッセイ(EIA)である。感度的には、RIAに今一歩およばないが、安全性の点で問題がなくRIAと同様の原理で使用できる上に、B/F分離の必要がないホモジニアスな系での測定も可能なため、欧米諸国では非常によく利用されている。

医療分野において、疾病の発生、進行度、治療効果等を知る上での特定の生体内物質(マーカー)の変化は非常に重要な意味を持つ。例えば腫瘍マーカーならば、CA-125、CA-19-9、AFP、CEAなどを始めとして、かなりの数が知られているが、すべての腫瘍に共通で、しかも早期発見の手助けとなるようなマーカーは現在までに知られていない。したがって、検査する際、腫瘍存在の可能性、発生部位等を正確に把握するためには、多項目のマーカーについて検査し、総合的に判断するしかただがない。ところが現状では、複数のデーターが知りたい場合、その数だけ測定を行うしかなく、採血の際の患者の苦痛、検査のために要する手間、時間が増大するばかりであった。

上に結合した被測定物質に蛍光活性を持たせ個々の微粒子の蛍光強度を測定することにより被測定物質の定量を行なうことを特徴とする微粒子の蛍光強度測定による定量方法を提供することにある。

ここで、nは、自然数であるが、2以上の自然数の場合に特に顕著な効果を発揮する。

粒子上の感応物質と被測定物質の間の特異的な反応、さらに、粒子上に結合した被測定物質に蛍光活性を持たせるための特異的な結合反応の代表的なものは抗原抗体反応であるが、それ以外でもホルモンとレセプター、糖とレクチン、アビジンとビオチン、IgG分画とProtein Aなどの反応も利用が可能である。

抗原抗体反応を例にとり、さらに詳しく説明する。測定対象が抗原となり得るもの(ハプテン等も含む)であれば、それに対応する抗体を微粒子に担持させておく。測定対象によっては、抗原・抗体が逆の組み合わせでもよい。

本発明では、複数の物質を、同時に定量する為

に微粒子（1～100 μ 程度の粒径のそろったもの）を予め、複数のグループに判別できるように構成しておく。その方法の一つは、粒径を複数のレベルにそろえておくことである。また粒子を螢光物質で標識づけする場合、螢光物質の有・無又は濃度、螢光の種類などにより、複数のグループに判別できる。そして、両者を組み合わせることにより、さらに多くの粒子群の判別が可能である。

微粒子としては、例えば赤血球などの細胞、金屈、リボソームなどのマイクロカプセル、ポリスチレン等のラテックス粒子等で、粒径1～100 μ 程度のものが利用できる。

微粒子に所定の感応物質、例えば抗体を担持させるには物理的に吸着させる方法、微粒子上の官能基を利用して化学的に結合させる方法などが知られている。

理解を容易にするため、まず $n=1$ を例にとって説明する。

均一粒径の微粒子に特定の抗体Bを担持する。Bは被測定物質Aと特異的に結合するものとす

なお、本発明については、粒子どうしの非特異的な凝集、あるいは抗原抗体反応による凝集を極力防がねばならず、そのために单クローニング抗体を用いるか、機械的な剥離によって簡単に分散するような比較的大きな粒子を用いるとか、或いは粒子濃度を稀薄にしておくことが好ましい。

微粒子のグループの判別法、螢光強度の測定法には、顕微鏡測光なども利用できるが、好ましい実施態様の一つとしては、これらの粒子を一つずつ、フローサイトメトリー法で測定する方法を挙げることができる。

フローサイトメトリー法とは、主として光学機器分析に関するものであり粒子を1個ずつ流し、粒子にレーザー光などをあてて、その散乱光を測定することにより、粒子の大きさ、色、或いは、予め粒子を螢光物質等で標識づけしておき、その螢光強度測定等により粒子の形質を測定するものである。又、いわゆるコウルターの原理により、粒子の容積（コウルターポリュームという）を電気的に測定する方法によるもの、これと光学測定と

る。一方で、やはりAと特異的に結合する抗体（以下第2抗体という）を螢光標識したものB'を作製しておく。

Bを担持した試薬とAを含有するサンプルを混合する。AとBの反応により、結果的に粒子上にAが結合する。さらに第2抗体B'を反応させることにより、粒子上にAの量に応じたB'が結合することになる。したがってサンプル中にある被測定物質の量に応じた螢光活性が粒子に与えられることになるわけである。

被測定物質が複数（n個）の場合、n種の区別し得る粒子各々にA₁～A_nに対する抗体B₁～B_nを別々に担持する。そして、A₁～A_nに対する螢光標識抗体即ち第2抗体B'₁～B'_nを作製しておく。ただし、この際A₁～A_nとB₁～B_nあるいはB'₁～B'_nは各々免疫学的交叉反応がないことが必要である。操作は前述のn=1の時と同様であり、最終的にn種の各粒子の螢光強度を測定することにより、A₁～A_nの定量ができるわけである。

を合わせたものも利用されている。

粒子をn個のグループへ特別するには、例えば粒子径で3グループ、螢光色素を付着したものとさせない粒子とを調整すれば合計6グループの粒子を調整できる。この場合、6種の抗体を各グループの粒子にそれぞれ担持させた試薬を、検体と接触させ、サンドウィッチ方式によりさらに前記螢光物質とは異った種類で標識された6種の第2抗体を、各グループの粒子へ別々に結合させた測定液をコウルターポリューム測定機能と螢光強度測定機能とを併せもった公知のフローサイトメーターで測定すると、粒子径と粒子につけた螢光の有無とにより粒子のグループ分けが出来る。

被測定物質の量は、第2抗体を標識づけした螢光物質の螢光強度測定により行われる。両螢光物質は、螢光強度測定の波長を選定することにより区別され、Aiの濃度が、微粒子のグループ毎即ち被測定物質ごとに測定できる。

尚、このグループ分けには、特開昭60-130882に示されている方法が利用できる。

(実施例 1)

ヒト総毛性ゴナドトロピン (hCG) の定量

(1) 試薬の調整

ポリスチレンビーズ (平均粒径 7 μ m) 固型分として 20 μ g をリン酸緩衝食塩水 (PBS pH 7.4) で 2 回洗浄する。それに、抗 hCG モノクローナル抗体 (anti hCG Mab) 200 μ g / ml を 2 ml 加え、37°C で 1 時間ゆるやかに搅拌した後 4°C で 1 晚放置する。PBS で遠心分離にて 2 回洗浄した後、保護コロイドとして 1% の牛血清アルブミン (BSA) を含む PBS 5 ml に懸濁し、固型分 0.4% のラテックス試薬として試験に供す。

(2) 検量線の作成

上記の試薬 30 μ l に異なる濃度の hCG を含む標準液を 100 μ l 加えよく混合する。1 時間室温で振盪した後、ウサギの抗 hCG 血清 (IgG 分画) 100 μ g / ml 50 μ l を加え混合する。再び 1 時間室温で振盪した後、FITC 標識したヤギの抗ウサギ IgG 血清 (IgG

ポリスチレンビーズ (平均粒径 10 μ m) 固型分として 10 μ g と、ヤギの抗 HSA 抗体 (IgG 分画) 200 μ g / ml を用いて、a) と同様の操作を行い、0.2% のラテックス試薬を得る。

c) 混合試薬

a)、b) の等量混合物 (各々 0.1%) を同時に 2 項目測定用試薬として試験に供する。

(2) 検量線の作成

異なる濃度の IgG、HSA を含む標準液 100 μ l と上記混合試薬 100 μ l を混合し、室温で 1 時間ゆるやかに搅拌する。その後 FITC-標識抗血清 (抗 HSA、IgG とともに抗体換算で 100 μ g / ml) 100 μ l を加え混合した後、1 時間室温でゆるやかに搅拌する。得られた反応液を PBS で 5 倍希釈し、フローサイトメトリー法によって分析する。得られた検量線を第 2 図に示す。

(効果)

本発明の方法により、検体中に含まれる 1 又は

分画) 200 μ g / ml を 50 μ l 加え、混合し、さらに 1 時間室温で振盪する。得られた反応液を PBS で約 10 倍に希釈した後フローサイトメトリー法によって分析する。得られた検量線を第 1 図に示す。

(実施例 2)

ヒト IgG、ヒト血清アルブミン (HSA) の同時測定

(1) 試薬の調整

a) ヒト IgG 分析用試薬

ポリスチレンビーズ (平均粒径 7 μ m) 固型分として 10 μ g をリン酸緩衝食塩水 (PBS pH 7.4) で 2 回洗浄する。それにアフィニティー精製した抗ヒト IgG 抗体 (ヤギ 200 μ g / ml) 5 ml を加え、37°C で 1.5 時間ゆるやかに搅拌する。PBS を用いて遠心分離にて 2 回洗浄した後、保護コロイドとして 1% の BSA を含む PBS 5 ml に懸濁し固型分 0.2% のラテックス試薬を得る。

b) HSA 分析用試薬

複数の被測定物質を同時に高感度で測定できる。

この分析の好ましい実施態様は微粒子の大きさ、蛍光活性の同時測定をする機能をもつフローサイトメトリー (FCM) の利用である。FCM を利用することによって、粒径の差、粒子自体に持たせた蛍光色素の種類、量の差、等により微粒子を区別し、その各々について、蛍光活性を測定することが可能になり、1 種又は 2 種以上の被測定物質の量を同時に高感度で測定できる。

こうして同時に複数項目の測定が可能になると、総合的な診断をする上で大きな手助けになり、偽陽性、偽陰性のような誤診断の減少、また各疾患の早期発見などに大きく寄与する。

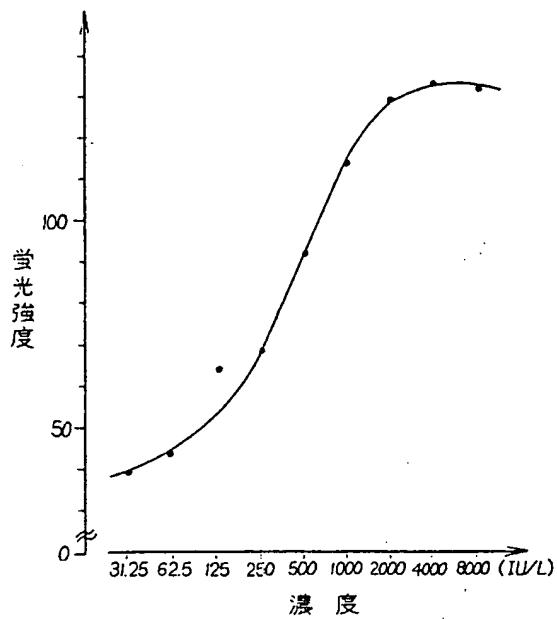
4. 図面の簡単な説明

第 1 図は hCG の濃度と蛍光強度との関係、第 2 図は、IgG 及び HSA の濃度と蛍光強度との関係を示す測定例のグラフである。

特許出願人 昭和電工株式会社

代 委 人 井理士 菊地精一

第1図



第2図

